

103. Beiträge zur Konstitutionsaufklärung des Nocardamins.

10. Mitteilung über antibakterielle Stoffe¹⁾

von A. Stoll, J. Renz und A. Brack.

(12. III. 51.)

In der vorhergehenden Mitteilung haben wir über die Isolierung, die chemische Zusammensetzung und über Eigenschaften eines neuen Antibiotikums aus einer *Nocardia*-Art (*Actinomycetaceae* Buchanan) berichtet. Die in reiner und kristallisierter Form isolierte Verbindung, die wir mit Nocardamin bezeichneten, besitzt eine spezifische antibiotische Wirksamkeit gegenüber Mycobakterien, ist dagegen unwirksam gegenüber Staphylokokken und Streptokokken, Coli-, Typhus- und Dysenteriebakterien, sowie gegenüber Hefe- und Schimmelpilzen. Das Nocardamin ist mit keinem der bis jetzt bekannten Antibiotika identisch, weshalb wir versuchen, seine Konstitution aufzuklären. Im folgenden berichten wir über verschiedene Abbaureaktionen und nehmen für Nocardamin, vorläufig als Ausdruck einer Arbeitshypothese, die Strukturformel Ia an, die unseren chemischen Befunden am besten gerecht wird.

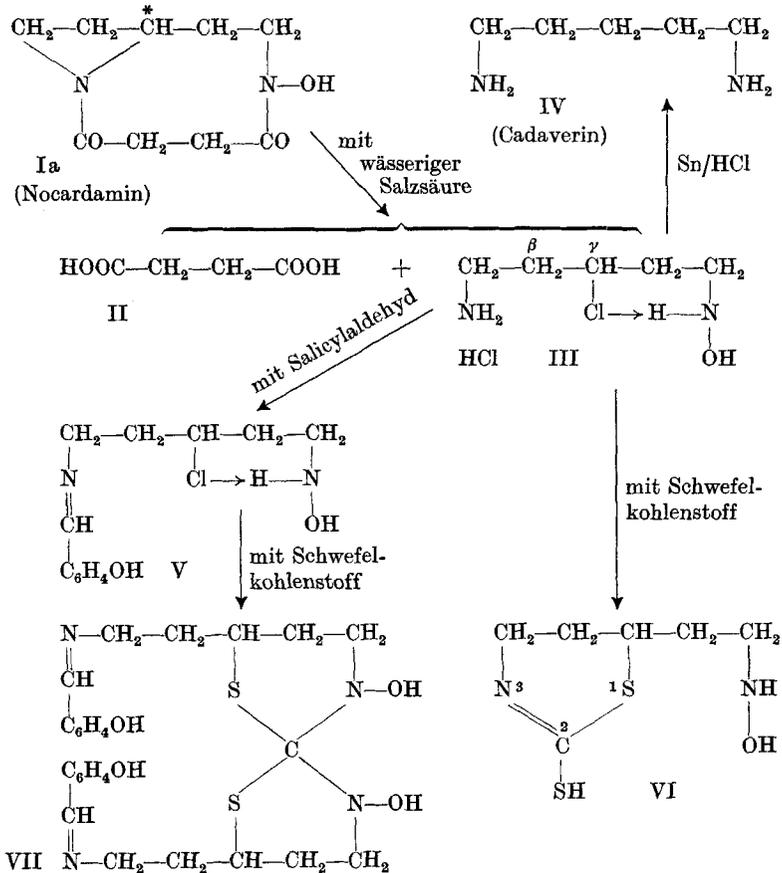
Das Nocardamin kristallisiert aus heissem Wasser oder aus wassergesättigtem Butanol in Nadeln, die bei 183—184° schmelzen; es ist optisch inaktiv. Aus den Analysen und aus den Ergebnissen der Abbaureaktionen ergibt sich für Nocardamin die Zusammensetzung $C_9H_{14}O_3N_2$. Einen Hinweis auf eine schwach saure Hydroxylgruppe liefert die Reaktion mit Eisenchlorid, bei welcher, besonders in methanolischer Lösung, eine intensive rotbraune Färbung entsteht. Mit Kupfersalzen tritt in wässriger Lösung eine schwache Grünfärbung auf. Das Nocardamin besitzt auch reduzierende Eigenschaften: Ammoniakalische Silberlösung wird bereits in der Kälte, *Fehling'sche* Lösung beim Erwärmen reduziert.

Bei der Acetylierung des Nocardamins in Eisessig-Pyridin-Acetanhydrid-Gemischen entsteht eine Monoacetylverbindung, die bei 118° schmilzt. Da Nocardamin keine basischen Eigenschaften aufweist und daher der Stickstoff weder als primäre noch als sekundäre Aminogruppe vorliegen kann, so wird sehr wahrscheinlich eine Hydroxylgruppe acetyliert.

Das Nocardamin setzt sich in methanolischer Lösung rasch mit Diazomethan um; ein einheitliches Reaktionsprodukt konnte indessen nicht gefasst werden.

¹⁾ 9. Mitteilung, Schweiz. Z. Path. Bakt. **14**, 225 (1951).

Einen Einblick in den Aufbau des Nocardamins gewährte vor allem die Hydrolyse mit verdünnter Säuren. Es entsteht nach längerem Kochen mit wässriger Salzsäure ein saures und ein basisches Spaltstück. Der saure Anteil II konnte als Bernsteinsäure identifiziert werden. Der basische Teil III, der ebenfalls gut kristallisiert (Smp. 139°), hat auf Grund der Analyse die Zusammensetzung $C_5H_{14}ON_2Cl_2$. Diese Verbindung besitzt nur eine basische Gruppe, die als Hydrochlorid vorliegt. Das zweite Chlor lässt sich titrimetrisch nicht erfassen, und die aus dem Hydrochlorid mit Alkali darstellbare, ebenfalls kristallisierte freie Base (Smp. 114–115°) enthält noch ein Atom Chlor, das demnach in diesem Spaltstück direkt an Kohlenstoff gebunden sein muss. Die *Van Slyke*-Bestimmung liefert Stickstoffwerte, die zwar mehr als einer, aber doch nicht zwei Aminogruppen entsprechen. Es kann daraus nur auf eine primäre Aminogruppe, die im Naturstoff offenbar mit einer Carboxylgruppe der Bernsteinsäure verknüpft ist, geschlossen werden. Das zweite Stickstoffatom des basischen Spaltstückes zeigt keine basischen Eigenschaften.



Wird für die Hydrolyse des Nocardamins an Stelle von Salzsäure verdünnte Bromwasserstoffsäure verwendet, so wird im basischen Spaltstück ein Bromatom direkt an Kohlenstoff gebunden. Mit verdünnter Jodwasserstoffsäure verläuft die Hydrolyse analog, d. h. unter Bindung von Jod an Kohlenstoff; in diesem Falle entsteht aber infolge der reduzierenden Wirkung der Jodwasserstoffsäure ein Gemisch von verschiedenen Reaktionsprodukten.

Ein analoges Verhalten wie Nocardamin zeigen beim Erwärmen mit verdünnten Halogenwasserstoffsäuren Äthylenimin- bzw. Propyleniminringe¹⁾. Die folgenden Erörterungen sprechen für das Vorliegen eines Propyleniminrings im Nocardamin, das demnach als ein Derivat des als Azetidin²⁾ bezeichneten Kohlenwasserstoff-Stickstoff-Vierrings anzusehen wäre.

Die bei der Aufspaltung des Nocardamins mit wässriger Halogenwasserstoffsäure entstehende halogenhaltige Base liefert bei der Acetylierung mit Acetanhydrid und Pyridin unter Eliminierung des am Kohlenstoff gebundenen Chlors eine kristallisierte Acetylverbindung (Smp. 83°). Dieselbe Acetylverbindung entsteht auch, allerdings in schlechter Ausbeute, beim Erhitzen der Base mit Acetanhydrid allein. Die Zusammensetzung dieser Acetylverbindung geht nicht klar aus den Analysenwerten hervor: Die Stickstoffbestimmungen sprechen dafür, dass drei Acetylgruppen eingetreten sind, während die Acetylbestimmungen nur auf zwei bis drei Acetylreste schliessen lassen. Immerhin scheint sich der Propyleniminring wieder gebildet zu haben, da bei der Hydrolyse der Acetylverbindung mit wässriger Salzsäure die halogenhaltige Base zurückgewonnen werden kann. Aus den vorliegenden Daten kann der Aufbau dieser Acetylverbindung noch nicht mit Sicherheit erkannt werden.

Die Reduktion der halogenhaltigen Base III mit Zinn und Salzsäure liefert unter Abspaltung des Chlors und des Sauerstoffs ein Diamin, das mit Cadaverin (IV) identifiziert werden konnte. Dadurch ist die Verknüpfung der fünf Kohlenstoffatome und der beiden Stickstoffatome im Nocardamin festgelegt: Die fünf Kohlenstoffatome bilden eine gerade Kette, die an ihren Enden die Stickstoffatome trägt. Wenn unsere Annahme zutrifft, dass im Nocardamin ein Propyleniminring vorhanden ist, so müsste bei dessen Aufspaltung durch Halogenwasserstoffsäure das Halogen sich mit dem mittelständigen Kohlenstoffatom der Kette verbinden, d. h. in gleicher Entfernung von den beiden Stickstoffatomen stehen. Für diese Annahme

¹⁾ *S. Gabriel*, B. **21**, 2664 (1888); *S. Gabriel & B. E. Lauer*, B. **23**, 87 (1890); vgl. auch *C. Columbic, J. S. Fruton & M. Bergmann*, J. Org. Chem. **11**, 518 (1946); *A. C. Cope, N. R. Nace, W. R. Hatchard, W. H. Jones, M. A. Stahmann & R. B. Turner*, Am. Soc. **71**, 554 (1949); *H. Bestian*, A. **566**, 210 (1950).

²⁾ *R. C. Elderfield*, Heterocyclic Compounds, Vol. I, 1950, in Kapitel 3 von *S. A. Ballard & D. S. Melstrom*, Derivatives of Azete, p. 80.

und demnach auch für die Existenz eines Propyleniminrings sprechen noch weitere interessante Umsetzungen, die mit dem halogenhaltigen basischen Spaltstück erzielt wurden. Die Kenntnis der Natur und der Lage der Hydroxylgruppe, die sich durch die Eisenchloridreaktion und bei der Acetylierung des Nocardamins zu erkennen gibt, ist dabei die Voraussetzung.

Es wurde schon weiter oben erwähnt, dass nur eine der beiden Stickstoffgruppen im basischen Spaltprodukt des Nocardamins basischen Charakter besitzt. Dies könnte durch die Bindung des einen Stickstoffatoms an Sauerstoff in einer Nitrosoverbindung oder einem Oxim oder einem Hydroxylamin bedingt sein. Im letzteren Fall könnte der basische Charakter durch strukturelle Eigenheiten abgeschwächt werden. Für die Annahme, dass der Sauerstoff mit Stickstoff verbunden ist, spricht vor allem das Verhalten der Verbindung bei der Reduktion mit Zinn und Salzsäure, bei der unter Austritt von Sauerstoff glatt ein primäres Amin, eben Cadaverin (IV) entsteht. Die Annahme einer Nitrosogruppe oder eines Oxims steht nicht im Einklang mit den Analysendaten; auch der Verlauf der Acetylierung spricht dagegen. Das basische Spaltstück reduziert ammoniakalische Silberlösung bereits in der Kälte, was für ein Hydroxylamin spricht. Das Fehlen von basischen Eigenschaften könnte dem Einfluss des γ -ständigen Chloratoms zugeschrieben werden. Dieses kann, wie die Formel III veranschaulicht, zur Bildung einer innermolekularen Protonbrücke („hydrogen bond“) zwischen dem Chlor und dem Stickstoff Anlass geben.

Auch die folgenden, weiteren Umsetzungen stehen im Einklang mit der Annahme einer Hydroxylamingruppe. Das halogenhaltige basische Spaltstück aus dem Nocardamin reagiert rasch mit 1 Mol Schwefelkohlenstoff. Es entsteht dabei unter Abspaltung von Halogenwasserstoff und unter Beteiligung der primären Aminogruppe eine kristallisierte Verbindung (Smp. 127°), deren Entstehung und Analyse für ein Dihydro-1,3-thiazin-Derivat VI sprechen. In dieser heterozyklischen Verbindung, die das die Hydroxylamingruppe beeinflussende Chloratom nicht mehr aufweist, kommen jetzt auch die schwach basischen Eigenschaften der Hydroxylamingruppe zum Vorschein. Eine wässrige Lösung dieser Verbindung hat ein pH von 8,3. Sie ist aber auch in Lauge leicht löslich, was mit dem Vorhandensein einer sauren SH-Gruppe am heterozyklischen Ring entsprechend der Formulierung VI im Einklang steht. Das gleiche Ringgerüst entsteht bekanntlich auch beim Umsetzen von γ -Brompropylamin¹⁾ und von γ -Chlorbutylamin²⁾ mit Schwefelkohlenstoff.

Die primäre Aminogruppe des basischen Spaltstücks III des Nocardamins lässt sich mit Aldehyden umsetzen und ist dann für eine

¹⁾ S. Gabriel & W. E. Lauer, B. **23**, 91 (1890).

²⁾ A. Luchmann, B. **29**, 1429 (1896); vgl. auch G. Pinkus, B. **26**, 1077 (1893).

weitere Kondensation mit Schwefelkohlenstoff blockiert. So bildet sich z. B. aus der chlorhaltigen Base und 1 Mol Salicylaldehyd das Produkt V (Smp. 149—150°), welches das an Kohlenstoff gebundene Chloratom noch enthält. Aus der bromhaltigen Base lässt sich die entsprechende Verbindung (Smp. 136—137°) herstellen. Diese halogenhaltigen Verbindungen, die als *Schiff'sche* Basen anzusprechen sind, lassen sich aber mit Schwefelkohlenstoff doch noch umsetzen, indem nun ein heterozyklisches Ringsystem unter Beteiligung der Hydroxylamingruppe aufgebaut wird. Unter Erwärmung und Abspaltung von Halogenwasserstoff entsteht aus 2 Mol der *Schiff'schen* Base und 1 Mol Schwefelkohlenstoff ein kompliziertes Ringsystem, dem auf Grund der Analysen und der Molekulargewichtsbestimmung wahrscheinlich die Konstitution eines Spiro-bis-dihydro-thiazin-(1,3)-Derivates VII zukommt.

Aus diesen Synthesen von heterozyklischen Verbindungen mit Schwefelkohlenstoff geht hervor, dass beide stickstoffhaltigen Gruppen der halogenhaltigen Abbaubase des Nocardamins befähigt sind, in Reaktion zu treten. An diesen Umsetzungen beteiligt sich in jedem Fall das an Kohlenstoff gebundene Halogen, das wie bereits erwähnt, sehr wahrscheinlich am mittleren Kohlenstoff der aus 5 C-Atomen bestehenden Kette gemäss Formel III gebunden ist. So ist es von beiden Stickstoffatomen gleich weit entfernt, befindet sich also zu beiden in γ -Stellung, so dass bei der Umsetzung mit Schwefelkohlenstoff sowohl mit der primären Aminogruppe, als auch mit der Hydroxylamingruppe, wenn die erstere besetzt ist, sechsgliedrige Ringe entstehen können. Würde das Halogenatom z. B. in β -Stellung zur primären Aminogruppe und demnach in δ -Stellung zur Hydroxylamingruppe stehen, so müsste einerseits bei der Umsetzung mit Schwefelkohlenstoff ein fünfgliedriger Ring (ein Thiazolinderivat), andererseits ein siebengliedriger Ring entstehen. Das letztere ist unwahrscheinlich, weil der heterozyklische Ring in unserem Fall zu leicht entsteht.

Man kann auch folgende Überlegung anstellen: Würde in der Base III das Chlor z. B. in β -Stellung zur primären Aminogruppe stehen, so müsste im Nocardamin ein Äthyleniminring vorliegen; die einem solchen innewohnende grosse Reaktionsfähigkeit besitzt aber Nocardamin nicht. Die δ -Stellung des Chlors zur primären Aminogruppe kann ausgeschlossen werden, da diese im Nocardamin einen Pyrrolidinring voraussetzen würde. Dieser wäre beständig und könnte nicht mit verdünnter wässriger Salzsäure unter Addition von Chlor aufgespalten werden.

Aus diesen Überlegungen kann man schliessen, dass bei der Abspaltung des Nocardamins mit verdünnter Halogenwasserstoffsäure das Halogen an das mittlere Kohlenstoffatom des basischen Restes gebunden wird. Es ist daher wahrscheinlich, dass im Naturprodukt

schlägen¹⁾ noch ein optisch aktives C-Atom enthält, nur als optisch inaktive Verbindung vor. Wir selbst haben in der Flechte *Cetraria islandica* Ach.²⁾ stets nur die Racemform der Usninsäure finden können, während wir aus andern Flechten sowohl die L- wie die D-Form der Usninsäure isolieren konnten.

Die von uns für Nocardamin vorgeschlagene Struktur Ia weist zwei Besonderheiten auf, nämlich den Azetidinring (Trimethyleniminring) und eine Hydroxylamingruppe. Der Azetidinring wäre damit u. W. zum ersten Mal in einem Naturprodukt nachgewiesen worden. In oxydierter Form, als β -Lactam (= 2-Azetidinon), liegt der entsprechende viergliedrige, stickstoffhaltige Ring im Penicillin vor. Die Formel Ia weist einen viergliedrigen und einen neungliedrigen heterozyklischen Ring auf, für welche u. W. in der Natur noch keine Analogien aufgefunden wurden.

Von Derivaten des Hydroxylamins sind bisher einige wenige als Naturstoffe isoliert worden, so z. B. aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) die Aminosäure Canavanin³⁾. Hydroxylamin-Abkömmlinge finden sich auch unter den Stoffwechselprodukten von niederen Organismen. Aus Kulturen von Leguminosenbakterien (*Rhizobium*) wurde die Oximinobernsteinsäure isoliert⁴⁾, die eines der primären Produkte der Stickstoffassimilation zu sein scheint. Im Kulturfiltrat des *Aspergillus flavus* wurde die Aspergillsäure⁵⁾ aufgefunden, die wie Nocardamin eine Hydroxamsäuregruppierung enthält. Die antibiotische Wirksamkeit der Aspergillsäure hängt wesentlich von der intakten Hydroxamsäurestruktur ab⁶⁾.

Das Cadaverin, von dem sich die basische Hälfte des Nocardamins ableitet, konnte im Mutterkornpilz nachgewiesen werden⁷⁾.

Wir haben sowohl die chlor- bzw. die bromhaltigen basischen Spaltstücke als auch die mit ihnen und Schwefelkohlenstoff synthetisierten heterozyklischen Verbindungen auf ihre antibiotische Wirksamkeit geprüft und mit der Wirkung des Nocardamins verglichen (siehe Tabelle 1):

Alle die in der Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen erweisen sich *in vitro* gegenüber *M. phlei* bedeutend weniger wirksam als das Nocard-

¹⁾ R. B. Woodward & G. Singh, Am. Soc. **71**, 758 (1949); **72**, 5351 (1950); Nature **165**, 928 (1950); B. G. Engel, W. Brzeski & Pl. A. Plattner, Helv. **32**, 1166, 1752 (1949).

²⁾ A. Stoll, A. Brack & J. Renz, Exper. **3**, 115 (1947).

³⁾ M. Kitagawa & T. Tomiyama, J. Biochem. Japan. **11**, 265 (1929); T. Tomiyama, J. Biol. Chem. **111**, 45 (1935).

⁴⁾ A. J. Virtanen & T. Laine, Biochem. J. **33**, 412 (1939); A. J. Virtanen & M. Hakala, Acta Chem. Scand. **3**, 1044 (1949).

⁵⁾ E. C. White, Science **92**, 127 (1940); J. D. Dutcher & O. Wintersteiner, J. Biol. Chem. **155**, 359 (1944); G. Dunn, G. T. Newbold & F. S. Spring, Nature **162**, 779 (1948).

⁶⁾ J. D. Dutcher, J. Biol. Chem. **171**, 321, 341 (1947); R. Tschesche, Angew. Ch. **62**, 158 (1950).

⁷⁾ Rieländer, Sitzungsber. d. Magdeburger Naturforsch. Ges. **7**, 173 (1908).

amin. Eine geringe wachstumshemmende Wirkung gegenüber *Staph. aureus*, die dem Nocardamin abgeht, ist hingegen beim Spiro-bis-dihydro-thiazin-derivat VII wahrzunehmen.

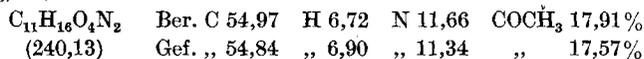
Tabelle 1.
Antibiotische Wirksamkeit im Lochplattentest.

	M. phlei	Staph. aureus	E. coli
Hydrochlorid der chlorhaltigen Base III	ca. 2 %*)	—	—
Hydrobromid der bromhaltigen Base	8 %	—	—
Dihydro-thiazin VI	4,5%	—	—
Spiro-bis-dihydro-thiazin VII .	1,5%	+ (ca. 4 OE/mg)	—

*) In % der Wirksamkeit von Nocardamin (siehe die 9. Mitteilung dieser Reihe, Schweiz. Z. Path. Bakt. 14, 225 (1951)).

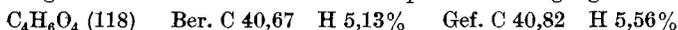
Experimenteller Teil.

1. Acetylverbindung des Nocardamins. Eine Lösung von 1,50 g Nocardamin in 7,5 cm³ Eisessig wird mit 15 cm³ Pyridin und 5 cm³ Essigsäureanhydrid versetzt. Das nach dem Pyridinzusatz wieder auskristallisierende Nocardamin geht nach dem Beifügen des Essigsäureanhydrids unter Erwärmung wieder in Lösung. Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird die Reaktionslösung im Vakuum eingedampft, der Eindampfrückstand mit Äther gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die allmählich auskristallisierende Acetylverbindung wird nach 12 Stunden filtriert (1,36 g), in 10 cm³ siedendem Wasser gelöst und die etwas trübe wässrige Lösung durch Filtration durch eine dünne Talksicht geklärt. Beim Konzentrieren der Lösung im Vakuum scheiden sich feine Nadeln (0,97 g) ab, die bei 118° schmelzen.



2. Aufspaltung des Nocardamins mit wässriger Salzsäure. Die Lösung von 2,0 g Nocardamin in 40 cm³ 2-n. Salzsäure wird während 6 Tagen am Rückfluss gekocht. Für eine möglichst vollständige Hydrolyse ist diese lange Reaktionszeit notwendig. Mit stärkerer Säure verläuft die Spaltung rascher, aber es werden viel mehr Zersetzungsprodukte gebildet. Die saure Reaktionslösung wird alsdann in einem Extraktionsapparat erschöpfend mit Äther ausgezogen, der nach dem Eindampfen die rohe Bernsteinsäure als kristallinen Rückstand (1,17 g) hinterlässt. In der sauren wässrigen Lösung befindet sich das Hydrochlorid des basischen Spaltstückes.

Saures Spaltstück: Die rohe Bernsteinsäure (1,17 g) wird im Hochvakuum sublimiert. Das bereits unterhalb 100° vollständig übergehende Sublimat wird noch aus wenig heissem Wasser umkristallisiert und erscheint daraus in Polyedern, die bei 184° schmelzen und in Mischung mit Bernsteinsäure keine Schmelzpunktserniedrigung aufweisen.



Beim Behandeln der Säure mit Essigsäureanhydrid entsteht das Säureanhydrid, das nach Sublimation im Hochvakuum und Kristallisation aus Benzol-Hexan bei 116–117° schmilzt und mit Bernsteinsäureanhydrid keine Schmelzpunktsdepression gibt.

Das saure Spaltstück aus dem Nocardamin ist demnach einwandfrei als Bernsteinsäure identifiziert. Theoretisch sind aus 2 g Nocardamin (C₉H₁₄O₃N₂, MG. 198, 13) 1,19 g Bernsteinsäure zu erwarten, wenn in der Molekel des Nocardamins 1 Mol dieser Säure eingebaut ist; Ausbeute an roher Bernsteinsäure, wie oben angegeben: 1,17 g.

Basisches Spaltstück III: Die saure, erschöpfend von Bernsteinsäure befreite Lösung wird im Vakuum ganz eingedampft und der Rückstand über festem Ätznatron getrocknet. Die anfangs ölige, bräunliche Substanz kristallisiert dabei ganz durch und wiegt 2,1 g. Sie wird mit 5 cm³ heissem absolutem Alkohol behandelt, worin sich die Kristalle nicht ganz auflösen. Beim Abkühlen scheiden sich grobe, noch etwas bräunlich gefärbte Nadeln (1,47 g) aus, die aus Alkohol unter Zusatz von etwas Kohle umkristallisiert werden. Aus dem klaren, farblosen Filtrat erhält man nach Zugabe von etwas Äther Nadeln (1,34 g), die bei 137—138° schmelzen. Zur Analyse wird die Substanz nochmals aus siedendem Alkohol umkristallisiert, wobei der Schmelzpunkt auf 139° ansteigt.

$C_5H_{14}ON_2Cl_2$ Ber. C 31,74 H 7,46 N 14,81%
(189) Gef. „ 31,61; 31,81 „ 7,89; 7,46 „ 14,91; 14,55%

Chlorbestimmung nach Volhard: 0,1042; 0,1725 g Substanz verbrauchen 10,79; 18,10 cm³ 0,1-n. AgNO₃.

$C_5H_{14}ON_2Cl_2$ (189) Ber. Cl 37,51% Gef. Cl 36,72; 37,20%

Titrimetrische Chlorbestimmung: 0,0939; 0,0848 g Substanz verbrauchen 4,82 cm³ 0,1-n. NaOH; 47,60 cm³ 0,01-n. NaOH (Indikator Methylrot).

$C_5H_{13}ON_2Cl, HCl$ (189) Ber. Cl 18,75% Gef. Cl 18,20; 19,90%

Bei längerem Verweilen der Verbindung in alkalischer Lösung wird auch das zweite, direkt an Kohlenstoff gebundene Chloratom allmählich abgespalten.

Die wässrige Lösung des Hydrochlorids hat ein pH von 3,5 bis 4,0 und gibt mit Eisenchlorid keine Färbung. Dagegen reduziert sie schon in der Kälte ammoniakalische Silberlösung und *Fehling'sche* Lösung.

Freie Base: 0,9040 g des Hydrochlorids werden in wässriger Lösung mit 0,1-n. NaOH unter Verwendung des *Beckman*-pH-Meters titriert. Am Äquivalenzpunkt hat die Lösung ein pH von 7,9, und es wurden 46 cm³ Lauge verbraucht, woraus sich ein Äquivalentgewicht von 196 errechnet. Die mit Lauge bis pH = 9 versetzte Lösung wird dann im Vakuum zur Trockne eingedampft, der Eindampfrückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen, die Lösung vom ausgeschiedenen Kochsalz abgetrennt und wieder eingedampft. Der Eindampfrückstand wird nun aus wenig absolutem Alkohol zur Kristallisation angesetzt, woraus sich Kristallbüschel (0,51 g), die bei 121—122° schmelzen, abscheiden. Bei weiterem Umkristallisieren aus wenig Alkohol geht der Schmelzpunkt eher etwas zurück, nämlich auf 118—120°, ein Zeichen dafür, dass die Verbindung nicht sehr stabil ist. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 50° getrocknet.

$C_5H_{13}ON_2Cl$ Ber. C 39,33 H 8,58 N 18,35 Cl 23,26%
(152,6) Gef. „ 39,29; 39,38 „ 9,04; 8,89 „ 18,44; 18,00 „ 23,31; 23,06%

Auch die freie Base reduziert sofort und schon in der Kälte ammoniakalische Silberlösung und *Fehling'sche* Lösung, gibt aber mit Eisenchlorid keine Färbung.

Acetylierung des basischen Spaltproduktes: 1 g des Hydrochlorids der Base wird in 10 cm³ Pyridin und 4 cm³ Essigsäureanhydrid gelöst. Nach 15stündigem Stehen bei 20° wird die Lösung im Vakuum eingedampft und der Eindampfrückstand mehrmals mit warmem Äther ausgezogen, wobei 1,09 g Pyridinhydrochlorid ungelöst zurückbleiben. Der Eindampfrückstand des ätherischen Auszugs wird getrocknet, wobei die anfangs ölige Substanz durchkristallisiert (1,19 g). Nach dem Waschen mit wenig Äther werden farblose Kristalle erhalten, die bei 82—83° schmelzen. Zur Analyse wird das Präparat aus Aceton-Äther umkristallisiert. Der Schmelzpunkt liegt dann bei 83—84°.

$C_{11}H_{18}O_4N_2$ Ber. C 54,50 H 7,52 N 11,56 3 COCH₃ 53,26%
(242,2) Gef. „ 54,26; 54,33 „ 7,44; 7,79 „ 11,72; 11,69 „ 47,69; 47,55%

Die Acetylbestimmung liefert stets etwas zu niedrige Werte, der Stickstoffwert spricht jedoch eher für eine Verbindung mit drei Acetylgruppen.

Das gleiche Produkt entsteht bei der Acetylierung des Hydrochlorids der Base durch Erhitzen mit Essigsäureanhydrid allein, aber in schlechter Ausbeute.

Bei der sauren Hydrolyse des Acetylierungsproduktes mit verdünnter Salzsäure entsteht wiederum die chlorhaltige Base. 600 mg der Acetylverbindung werden in 12 cm³ n. Salzsäure während 8 Stunden auf dem Dampfbad erwärmt. Dann wird die Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand im Exsikkator getrocknet. Nach dem Aufnehmen des bräunlichen Harzes in wenig Alkohol und Zusatz von Äther scheidet sich die Substanz zuerst harzig ab, verwandelt sich aber nach längerem Stehen zum Teil in Kristalldrusen (100 mg), die zuerst aus Alkohol-Äther unter Zusatz von Kohle und daraufhin noch aus wenig absolutem Alkohol umkristallisiert werden. Die nun farblosen Nadeln schmelzen bei 136–137° und geben mit dem oben beschriebenen Hydrochlorid der Base keine Schmelzpunktsdepression. Auch die analytischen Befunde sind für beide Präparate dieselben.

3. Aufspaltung des Nocardamins mit Bromwasserstoff. Die Lösung von 1,0 g Nocardamin in einem Gemisch von 16 cm³ Wasser und 4 cm³ einer ca. 60-proz. Bromwasserstoffsäure wird während 60 Stunden am Rückfluss gekocht und darauf die saure Lösung im Extraktionsapparat erschöpfend mit Äther ausgezogen. Aus der Ätherlösung konnten 0,45 g Bernsteinsäure isoliert werden. Die hellbraune, wässrige Lösung wird dann von wenig braunen Flocken abfiltriert und im Vakuum ganz eingedampft. Nach dem Trocknen über Ätznatron kristallisiert der anfangs harzige Eindampfrückstand in langen Nadeln durch (1,45 g). Das Rohkristalliat wird in 10 cm³ warmem absolutem Alkohol aufgenommen und die Lösung mit 10 cm³ Äther versetzt, worauf sich die Lösung trübt und nach einigen Stunden 1,02 g Kristalle, die bei 136–137° schmelzen, ausscheidet. Das Präparat wird zur Analyse noch zweimal aus wenig absolutem Alkohol umkristallisiert und bildet dann einheitliche kompakte Nadelbüschel, die bei 140° schmelzen. Zur Analyse wurde die Verbindung im Exsikkator bei Zimmertemperatur getrocknet.

$C_5H_{14}ON_2Br_2$ Ber. C 21,59 H 5,04 N 10,08 Br 57,50%
(277,9) Gef. ,, 21,53 ,, 5,27 ,, 9,81 ,, 57,65%

Die titrimetrische Brombestimmung ergab wie erwartet die Hälfte des oben gefundenen Wertes:

$C_5H_{14}ON_2Br_2$ (277,9) Ber. 2 Br 57,50 1 Br 28,75% Gef. Br. 29,88%

Das bromwasserstoffsäure Salz der bromhaltigen Base zeigt fast den gleichen Schmelzpunkt wie das chlorwasserstoffsäure Salz der chlorhaltigen Base; ersteres ist aber leichter löslich in absolutem Alkohol. Die wässrige Lösung der Bromverbindung gibt mit Eisenchlorid keine Färbung.

Bei der Acetylierung der bromierten Base mit Essigsäureanhydrid in Pyridin entsteht das gleiche Reaktionsprodukt wie aus der oben beschriebenen chlorierten Verbindung.

4. Die Reduktion der chlorhaltigen Base III. 200 mg des Hydrochlorids der chlorhaltigen Base werden mit 200 mg Zinn und 1,5 cm³ konz. Salzsäure auf dem Dampfbad vorsichtig erwärmt, bis alles Zinn in Lösung gegangen ist. Die Lösung wird dann eingedampft, der über Ätznatron scharf getrocknete Rückstand in Wasser gelöst und die vom Zinn durch Einleiten von Schwefelwasserstoff und Abfiltrieren des Zinnsulfids befreite Lösung wieder zur Trockene eingedampft. Der Eindampfrückstand kristallisiert dabei in langen Nadeln (200 mg) und wird mehrmals aus Alkohol-Äther und Methanol-Äther umkristallisiert. Es werden schliesslich Nadeln erhalten, die bei 250–252° schmelzen. Die Mischung mit Cadaverinhydrochlorid zeigt keine Schmelzpunktsdepression.

$C_5H_{14}N_2, 2HCl$ Ber. C 34,30 H 9,20 N 16,00 Cl 40,51%
(175,0) Gef. ,, 34,00 ,, 9,02 ,, 16,71 ,, 40,81%

Das Reduktionsprodukt aus der chlorhaltigen Base ist identisch mit Cadaverin.

5. Umsetzung der chlorhaltigen Base III mit Salicylaldehyd zu der Schiff'schen Base V. 0,38 g des Hydrochlorids der chlorhaltigen Base (Smp. 139°) werden in 2 cm³ n. NaOH gelöst und mit 0,22 cm³ Salicylaldehyd versetzt, der beim Schütteln mit gelber Farbe in Lösung geht. Nach mehrstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird die Lösung von wenigen dunkleren Flocken abfiltriert und eingedampft,

worauf man den Eindampfrückstand in wenig absolutem Alkohol löst und die gelbe Lösung vom Kochsalz abfiltriert. Die alkoholische Lösung wird eingedampft, der Rückstand in 5 cm³ Alkohol aufgenommen, nochmals von wenig Kochsalz abfiltriert und die klare Lösung mit 5 cm³ Äther verdünnt. Es scheiden sich allmählich einheitliche Kristallbüschel (0,29 g) ab, die bei 148—149° schmelzen und deren Schmelzpunkt nach nochmaligem Umkristallisieren aus Alkohol-Äther auf 149—150° steigt.

C₁₂H₁₇O₂N₂Cl (256,7) Ber. N 10,91 Cl 13,83% Gef. N 10,61 Cl 13,50%

Das Kondensationsprodukt V gibt in wässriger Lösung mit Eisenchlorid eine violette Färbung. Ammoniakalische Silberlösung wird langsam schon in der Kälte reduziert, rascher beim Erwärmen.

Auch bei Gegenwart eines Überschusses an Salicylaldehyd kondensiert sich die Base nur mit einem Mol Aldehyd unter Bildung des eben beschriebenen Produktes.

Ganz analog verläuft die Umsetzung der bromhaltigen Base mit Salicylaldehyd zur Schiff'schen Base. Diese bromhaltige Verbindung kristallisiert aus Alkohol-Äther in langgestreckten, zu Drusen vereinigten Blättchen, die bei 132—135° schmelzen. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Alkohol-Äther steigt der Schmelzpunkt auf 136—137°. Zur Analyse wurde bei 20° zur Gewichtskonstanz getrocknet.

C₁₂H₁₇O₂N₂Br Ber. C 47,83 H 5,66 N 9,30 Br 26,54%
(301,06) Gef. „ 47,35 „ 5,95 „ 9,88 „ 25,29%

6. Umsetzung der halogenhaltigen Base III mit Schwefelkohlenstoff; Bildung eines Dihydro-thiazinderivates VI. 1,90 g des Chlorhydrats der chlorhaltigen Base werden in 5 cm³ kalter 4-n. Natronlauge gelöst und sofort mit 0,8 cm³ Schwefelkohlenstoff kräftig durchgeschüttelt. Dabei tritt Gelbfärbung und schwache Erwärmung ein; nach wenigen Minuten entfärbt sich das Reaktionsgemisch wieder, und beim Kratzen mit dem Glasstab erstarrt die Lösung zu einem Kristallbrei. Die weissen Kristalle werden nach einer Stunde abfiltriert, mit kaltem Wasser ausgewaschen und getrocknet (1,69 g). Sie schmelzen unter Zersetzung bei 129—130°. Zur weiteren Reinigung wird das Präparat mehrmals aus heissem Wasser umkristallisiert und erscheint dann in Form von glasklaren, schwach gelblichen, dünnen, sechseckigen Plättchen (1,18 g), die bei 130—131° unter Aufschäumen schmelzen. Beim weiteren Umkristallisieren nehmen die Kristalle einen bräunlichen Stich an, der Schmelzpunkt sinkt dabei auf 127°, was auf eine allmähliche Zersetzung hindeutet. Zur Analyse wurde die Substanz bei 50° im Hochvakuum getrocknet.

C₆H₁₂ON₂S₂ Ber. C 37,46 H 6,30 N 14,57 S 34,13%
(192,2) Gef. „ 37,14; 37,23 „ 6,89; 6,81 „ 14,95; 14,80 „ 33,93; 34,65%

Aus dem Hydrobromid der bromhaltigen Base entsteht mit Schwefelkohlenstoff genau das gleiche Dihydro-thiazin-(1,3)-Derivat.

In wässriger Lösung gibt diese Verbindung mit Eisenchlorid eine rotbraune Färbung, die rasch nach Braunviolett und schliesslich in ein stumpfes Violett übergeht; in methanolischer Lösung entsteht mit Eisenchlorid eine intensive grüne Färbung. *Fehling'sche* Lösung wird sofort entfärbt.

Bei dieser Verbindung, die kein an Kohlenstoff gebundenes Chlor mehr enthält, kommen die schwach basischen Eigenschaften der Hydroxylaminogruppe zur Geltung. Eine wässrige Lösung hat ein pH von 8,3. Bei der Titration mit Hilfe eines *Beckman*-pH-Meters mit 0,1-n. HCl beobachtet man einen Äquivalenzpunkt bei pH 4. Der Säureverbrauch entspricht dann allerdings einem Äquivalentgewicht von 100, d. h. es sind ca. 2 Mol Säure verbraucht worden. Im Verlauf der Titration stellen sich die pH-Werte nur langsam ein, so dass der heterozyklische Ring offenbar noch einer weiteren Veränderung unterliegt.

7. Umsetzung des Salicylaldehyd-Kondensationsproduktes V mit Schwefelkohlenstoff. 0,25 g (= 1 mMol.) des Kondensationsproduktes aus der chlorhaltigen Base vom Smp. 147—148° werden in 0,25 cm³ eiskalter 4-n. Natronlauge

gelöst. Die Lösung wird nach Zugabe von 0,038 g (= 0,55 mMol.) Schwefelkohlenstoff kräftig durchgeschüttelt und erstarrt unter schwacher Erwärmung nach wenigen Minuten zu einem Kristallbrei. Die abgesaugten und mit eiskaltem Wasser gewaschenen gelblichen Kristalle (0,23 g) werden aus heissem Wasser vorsichtig umkristallisiert. Eine anfangs ölige Abscheidung geht allmählich vollständig in dünne Blättchen über, die unter Aufschäumen bei 123° schmelzen. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus heissem Wasser schmilzt die Verbindung bei 121–122°; da sie in heissem Wasser wenig beständig ist, wird sie vorteilhaft in kaltem Methanol aufgenommen und daraus durch Zugeben von ca. 3 Teilen Äther in schön kristalliner Form ausgeschieden.

$C_{25}H_{32}O_4N_4S_2$	Ber. C 58,10	H 6,26	N 10,84	S 12,40%
(516,3)	Gef. „ 58,32; 57,88	„ 6,62; 6,61	„ 11,08; 11,19	„ 11,94; 12,15%

Die ebullioskopische Molekulargewichtsbestimmung in Methanol ergab ein Molekulargewicht von 536.

Aus dem Kondensationsprodukt der bromhaltigen Base mit Salicylaldehyd entsteht mit CS_2 die gleiche Verbindung, die sehr wahrscheinlich ebenfalls das Spiro-bis-dihydrothiazin-(1,3)-Derivat VII darstellt.

Eine wässrige Lösung dieses Präparates gibt mit Eisenchlorid nur eine bräunliche Färbung, die allmählich einen violetten Ton annimmt; in methanolischer Lösung entsteht eine braune Farbe.

Zusammenfassung.

Bei der Hydrolyse von Nocardamin ($C_9H_{14}O_3N_2$, Smp. 184°), einem Antibiotikum aus einer Nocardia-Art (Actinomycetaceae Buchanan), mit wässriger Halogenwasserstoffsäure entsteht Bernstein-säure und das Salz eines halogenhaltigen basischen Spaltstückes, $C_5H_{13}ON_2Hal$, $HHal$. Dieses enthält eine primäre Amino- und wahrscheinlich eine Hydroxylamingruppe, mit denen die beiden Carboxylgruppen der Bernsteinsäure säureamidartig verknüpft sind. Durch Reduktion wird das basische Spaltstück der sauren Hydrolyse in Cadaverin übergeführt. Die von uns für Nocardamin ins Auge gefasste Konstitutionsformel Ia trägt diesen Befunden und den Ergebnissen verschiedener chemischer Umsetzungen, die mit dem basischen Spaltstück durchgeführt wurden, Rechnung. Nocardamin wäre auf Grund dieser Formulierung durch einen Trimethyleniminring (Azetidinring) und durch eine Hydroxylamingruppierung besonders gekennzeichnet. Der Azetidinring wäre damit u. W. in einem Naturprodukt erstmals aufgefunden worden. Über die endgültige Aufklärung der Struktur des Nocardamins hoffen wir später berichten zu können.

Pharmazeutisch-Chemisches Laboratorium
Sandoz, Basel.